

# Cjeloegzomsko sekvenciranje u kliničkoj primjeni - iskustvo Kliničkog bolničkog centra Split

Bernarda Lozić<sup>1</sup>, Marin Ogorevc<sup>2</sup>, Tomislav Smoljo<sup>3</sup>, Dora Knezović<sup>1</sup>

*Cilj:* izvijestiti o učinkovitosti cjeloegzomskog sekvenciranja (WES) kod bolesnika u Kliničkom bolničkom centru Split u razdoblju od siječnja 2021. do prosinca 2024.

*Metode:* Analiza WES-om provedena je kod 64 bolesnika s neurorazvojnim poremećajima, 20 bolesnika s malformacijama i 53 bolesnika s poremećajima koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav.

*Rezultati:* Kod 34,38 % bolesnika s neurorazvojnim poremećajima je analiza WES-om dovela do uspostavljanja dijagnoze, kod 32,81 % pronađene su varijante u genima potencijalno povezanim s fenotipom, a kod 32,81 % nisu pronađene značajne varijante. U slučaju malformacija, kod 40 % je uspostavljena dijagnoza nakon analize WES-om, kod 35 % pronađene su varijante u genima potencijalno povezanim s fenotipom, a kod 25 % nisu pronađene značajne varijante. Od poremećaja koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav, analiza WES-om je bila najuspješnija u slučaju neuromišićnih poremećaja (dijagnoza postavljena u 45,45 % slučajeva), a najmanjih uspjeh je utvrđen kod bolesnika s epilepsijom (dijagnoza postavljena u 16,67 %).

*Zaključak:* WES je učinkovit genetički test za bolesnike s neurorazvojnim poremećajima i malformacijama te bi se trebao koristiti rano u dijagnostičkoj obradi jer može dovesti do uspostavljanja dijagnoze kod velikog broja slučajeva, a od poremećaja koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav, analiza WES-om je učinkovita za neuromišićne poremećaje, dok bi se za ostale poremećaje trebali primarno koristiti ciljani paneli gena ili sekvenciranje kliničkog egzoma.

**Ključne riječi:** NEURORAZVOJNI POREMEĆAJI; PRIROĐENE MALFORMACIJE; EGZOMSKO SEKVENCIRANJE; SEKVENCIRANJE SLJEDEĆE GENERACIJE

## UVOD

Projekt ljudskog genoma i tehnološka dostignuća poput sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next-generation sequencing*) omogućili su

dijagnostičko sekvenciranje cijelog egzoma (WES, engl. *Whole Exome Sequencing*) ili sekvenciranje cijelog genoma (WGS, engl. *Whole Genome Sequencing*) u kliničkoj medicini, čime je omogućeno ispitivanje svih gena kod bolesnika s kompleksnim

<sup>1</sup>Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Split, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Spinčićeva 1, 21000 Split

<sup>2</sup>Zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, 21000 Split

<sup>3</sup>Klinika za onkologiju i radioterapiju, Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, 21000 Split

fenotipom, a time i mogućnost detekcije genetičkog uzroka bolesti (1, 2).

WES-om se analiziraju protein-kodirajuće regije (egzoni) od približno 23 000 gena koje obuhvaćaju oko 1,5 % – 2 % čitavog humanog genoma. Iako egzoni čine samo oko 2 % cijelog genoma, smatra se da se unutar njih nalazi oko 85 % svih poznatih varijanti koje uzrokuju nasljedne bolesti u ljudi. Ako se istovremeno sekvenciraju i egzoni dodatnih članova obitelji, kao u analizi klasičnog trio WES-a (dijete i oba biološka roditelja) povećava se vjerojatnost za pronalaženje genetskog uzroka fenotipa zbog mogućnosti otkrivanja *de novo* varijanti i određivanja pozicije složenih heterozigotnih varijanti u *cis* ili *trans* položaju. Analiza WES-a prvenstveno je usmjerena na gene za koje je prethodno utvrđena povezanost s genetskim bolestima u ljudi i u prosjeku se identificiraju uzročne varijante u rasponu od 25 do 40 % ispitanika (3-7). Nedavna analiza baze podataka Orphanet pokazala je da oko 3-6 % svjetske populacije ima rijetku bolest (tj. bolest s prevalencijom <1 u 2000 ljudi) i da 72 % rijetkih bolesti ima pronađen genetski uzrok (8). Međunarodni konzorcij za istraživanje rijetkih bolesti navodi da bi do 2027. godine svim bolesnicima koji dođu tražiti liječničku pomoć zbog sumnje na rijetku bolest dijagnoza trebala biti postavljena u roku od 1 godine, ako je dotični poremećaj opisan u medicinskoj literaturi. Ako analiza varijanti egzona gena za koje je prethodno utvrđena povezanost s bolestima u ljudi nije informativna, analiziraju se moguće varijante u kandidatnim genima koji za sada nisu povezani s bolestima, ali imaju molekularna svojstva koja upućuju da bi se u budućnosti mogli klasificirati kao uzročni za nastanak bolesti. Kontinuirano praćenje i proučavanje rezultata sekvenciranja egzoma i genoma iz različitih laboratorija diljem svijeta te povezivanje s fenotipom bolesnika putem internetskih platformi, može pomoći u određivanju jesu li nove varijante u kandidatnim genima povezane sa zdravstvenim stanjima bolesnika. Jedna od takvih platformi je GeneMatcher (<https://genematcher.org>), besplatna internet-ska baza podataka koje omogućuje povezivanje kliničara i istraživača iz cijelog svijeta koji proučavaju isti gen s ciljem utvrđivanja povezanosti gena s fenotipom (9).

ACMG (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*) preporučuje korištenje WES-a

kao testa prvog izbora (ili drugog izbora, ako fenotip indicira drugu vrstu genetskog testiranja) u bolesnika s jednom ili više prirodnih anomalija, razvojnim zaostajanjem i/ili intelektualnim poteškoćama s početkom prije dobi od 18 godina (10). Ovaj pristup ima kliničku korisnost jer značajno povećava vjerojatnost za pronalaženje genetskog uzroka kod bolesnika s ranom prezentacijom bolesti te složenim, heterogenim i nespecifičnim simptomima u usporedbi s manje obuhvatnim genetskim testiranjem specifičnog panela gena, što omogućava brže postavljanje dijagnoze (11). U ovom istraživanju prikazat će se klinička korisnost WES-a u pronalaženje genetskog uzroka kod naših bolesnika i naši rezultati će se usporediti s drugim kliničkim studijama.

## ISPITANICI I METODE

U ovom radu prikazat će se rezultati analize WES-a i trio WES-a kod bolesnika iz Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split kod kojih je analiza provedena u nekoliko dostupnih Europskih laboratorija (Blueprint Genetics, Gendia-Belgium, Centogene GmbH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, University Medical Center Ljubljana). Sekvenciranje metodom po Sangeru i obiteljska segregacijska analiza su provedene u slučaju pronalaska patogenih/vjerojatnih patogenih varijanti ili varijanti nejasnog kliničkog značaja (VUS, engl. *variant of uncertain significance*) u probanda pri Kliničkoj bolnici Sveti Duh, Zagreb.

Kriteriji za testiranje bio je kompleksan fenotip bolesnika sa sumnjom na genetsku bolest, a uključuje sljedeće skupine bolesnika:

- 1) bolesnici s neurorazvojnim poremećajima (obuhvaća bolesnike s intelektualnim deficitom, globalnim razvojnim zaostajanjem i/ili poremećaj iz autističnog spektra);
- 2) bolesnici s malformacijama organa;
- 3) bolesnici s poremećajima koji zahvaćaju primarno jedan organski sustav, a prethodnim genetskim pretragama nije pronađena etiologija bolesti.

Kod svih je prethodno provedena sva potrebna multidisciplinarna klinička obrada, potom je uslijedila evaluacija prethodnih genetičkih nalaza među kojima su: sekvenciranje ciljanih genskih panela, komparativna genomska hibridizacija na mi-

**Tablica 1.** Rezultati WES-a ovisno o uputnoj dijagnozi

Uputna dijagnoza		Rezultati analize WES-a			
		Uspostavljena dijagnoza, N(%)	Pronađen VUS, N(%)	Negativna, N(%)	Ukupno, N
Neurorazvojni poremećaj		22 (34,38)	21 (32,81)	21 (32,81)	64
Malformacije organa		8 (40)	7 (35)	5 (25)	20
Poremećaji koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav	Epilepsije	2 (16,67)	5 (41,67)	5 (41,67)	12
	Neuromišićni poremećaji	5 (45,45)	1 (9,09)	5 (45,45)	11
	Kardiovaskularni poremećaji	0 (0)	3 (60)	2 (40)	5
	Metabolički ili endokrini poremećaji	1 (20)	1 (20)	3 (60)	5
	Bolesti vezivnog tkiva	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5
Ostalo		3 (20)	8 (53,33)	4 (26,67)	15
Ukupno		42 (30,66)	48 (35,03)	47 (34,31)	137

kropostroju (Array-CGH), analiza trinukleotidnog ponavljanja za Fragilni X sindrom te metilacijske studije.

Provedeno je genetsko savjetovanje s bolesnikom (ili njihovim skrbnikom), objašnjena svrha genetičkog test i mogući rezultati. Potpisan je informirani pristanak prema protokolima gore navedenih laboratorija i u skladu s deklaracijom iz Helsinkija te s uzorkom poslan u jedan od laboratorija.

Analizirani parametri vezani za bolesnike su: spol, dob u trenutku slanja na analizu te kategorija uputne dijagnoze. Analizirani parametri vezani za pronađene varijante su: zignost, učinak varijante na funkciju gena, ACMG klasifikacija i reklasifikacija varijante, način nasljeđivanja te segregacijska analiza. Rezultati istraživanja su analizirani s pomoću Microsoft Excel softvera.

## REZULTATI

WES analize su napravljene tijekom četverogodišnjeg razdoblja u KBC-u Split. Napravljeno je 137 WES analiza, od čega je 56 probanada ženskog spola (40,88 %), a 81 muškog spola (59,12 %). Medijan dobi svih bolesnika je bio 5 godina (IQR 2-11 godina). Najčešća uputna dijagnoza je bila neurorazvojni poremećaj, a od poremećaja koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav najčešća uputna dijagnoza bila je epilepsija (Tablica 1).

Kod 42 (30,66 %) bolesnika su pronađene varijante klasificirane kao patogene ili vjerojatno patogene i utvrđena je genetička etiologija njihovog fenotipa, od čega je 27 klasificirano izravno WES-om, a 15 je originalnim nalazom WES-a kla-

sificirano kao VUS, no nakon provedene segregacijske analize ili provjere ACMG kriterija prilikom kontrolnog pregleda je reklasificirano u patogenu ili vjerojatno patogenu varijantu. Kod 48 (35,03 %) bolesnika nije pronađena genetička etiologija fenotipa, ali su pronađeni VUS-ovi u genima potencijalno povezanim s fenotipom; kod 25 bolesnika su pronađeni VUS-ovi u poznatim uzročnim genima, a kod 23 u kandidatnim genima. Sve pronađene varijante u kandidatnim genima su prijavljene u Genematcher platformu. Kod 47 (34,31 %) bolesnika nisu pronađene potencijalno značajne varijante povezane s fenotipom. Od 42 pacijenta kojima je dijagnosticirana genetska bolest WES-om, 32 (76,19 %) je imalo autosomno dominantnu bolest (od toga su 2 bolesnika imala dvije autosomno dominantne bolesti, a jedan autosomno recesivnu i dominantnu bolest), 9 (21,43 %) bolesnika imalo je autosomno recesivnu bolest te 2 (4,76 %) X-vezanu bolest.

Sveukupno je pronađeno 138 varijanti potencijalno povezanih s fenotipom kod 91 bolesnika, od toga je kod 56 (61,54 %) bolesnika pronađena samo 1 varijanta, dok je kod ostalih 35 (38,46 %) pronađeno 2 ili više varijanti (najviše 4). Prema zignosti, 106 (76,81 %) varijanti je bilo u heterozigotnom obliku, 26 varijanti (18,84 %) u složenom heterozigotnom obliku, 1 (0,72 %) u homozigotnom te 5 (3,62 %) u hemizigotnom obliku. Prema vrsti varijante, 79 (57,25 %) varijanti je klasificirano kao *missense*, 14 (10,14 %) varijanti kao *stop gained*, 11 (7,97 %) varijanti kao *splicing* varijante, 12 (8,70 %) varijanti kao *frameshift deletion*, 9 (6,52 %) varijanti kao *frameshift duplication*, 5 (3,62 %) varijanti kao *inframe deletion*, 3 (2,17 %) varijanti kao *inframe duplication*.

varijante kao parcijalni geni, 2 (1,45 %) varijante kao intronske varijante, 2 (1,45 %) varijante kao duplikacije te 1 (0,72 %) varijanta kao *start loss* varijanta. Prema ACMG klasifikaciji, 95 (68,84 %) varijanti je originalno klasificirano kao VUS, 23 (16,67 %) kao vjerojatno patogene i 20 (14,49 %) kao patogene. Za 44 (45,45 %) varijante je provedena segregacijska analiza te je utvrđeno da je 20 (42,86 %) varijanti nastalo *de novo*, a 24 (54,55 %) naslijeđeno. Od 95 VUS varijanti, 17 (17,89 %) je naknadno reklasificirano, od toga 15 varijanti u patogenu ili vjerojatno patogenu i 2 varijante u benigne. Jedna vjerojatno patogena varijanta je reklasificirana u VUS.

## RASPRAVA I ZAKLJUČCI

Najveća skupina bolesnika koja je bila podvrgnuta analizi WES-om u KBC-u Split tijekom promatranog perioda su bili bolesnici s neurorazvojnim poremećajem (46,72 %). To je u skladu s dosadašnjom medicinskom literaturom koja navodi kliničku korisnost WES analize u evaluaciji bolesnika s neurorazvojnim poremećajima (12). Štoviše, istraživanja navode da rana primjena dijagnostičkog WES-a kod bolesnika s neurorazvojnim poremećajima može dovesti i do sveukupnog smanjenja troškova dijagnostičke obrade (13). Neurorazvojni poremećaji imaju izrazitu genetičku heterogenost, a to je bio slučaj i kod naših bolesnika s obzirom na to da su svi imali jedinstvenu dijagnozu (Tablica 2).

Uspjeh WES-a u postavljanju dijagnoze i pronalasku varijanti u kandidatnim genima kod naših bolesnika prati trendove iz ostalih dijelova svijeta (4, 6, 7, 14-24). Bitno je naglasiti da su u tri istraživanja u kojima je stopa uspješnosti WES-a u postavljanju dijagnoze bila značajno veća od prosjeka bili uključeni većinom bolesnici iz konsagvinih obitelji Saudijske Arabije ili je istraživanje provedeno na maloj skupini odabranih ispitanika s popratnim anomalijama (Tablica 3).

Ukoliko se analizom WES-om ne pronađu značajne varijante kod bolesnika s neurorazvojnim poremećajima, ako je moguće, trebala bi se provesti analiza WGS-om. U jednom istraživanju na 50 bolesnika s teškim intelektualnim deficitom i negativnim genetičkim testovima (array-CGH i WES), analiza WGS-om je dovela do konačne dijagnoze u 21 (42 %) bolesnika (25). Stopa pronalaska vari-

**Tablica 2.** Bolesnici s neurorazvojnim poremećajima kojima je WES-om utvrđena dijagnoza

Dob (godine)	Spol	Gen	Vrsta varijante	OMIM bolesti
4	muški	CHD5	nonsense	#619873
2	muški	KDM5C	frameshift	#300534
2	ženski	CREBBP	missense	#180849
7	ženski	CDK13	frameshift	#617360
3	ženski	KDM6B	inframe deletion	#618505
15	ženski	SPEN	nonsense	#619312
9	ženski	TCF4	partial gene	#610954
9	muški	CHD3	missense	#618205
4	muški	KDM3B	missense	#618846
2	muški	ADSL	missense	#103050
5	muški	FOXP1	splicing	#613670
3	muški	LARP7	frameshift + nonsense	#615071
9	ženski	CUL3	frameshift	#619239
11	muški	CAMK2A	missense	#617798
1	muški	STAG1	frameshift	#617635
12	ženski	ARFGEF1	splicing	#619964
3	ženski	CACNA1A	missense	#617106
3	ženski	KCNC1	missense	#616187
5	ženski	AGO2	missense	#619149
11	muški	GRIN1	missense	#614254
18	muški	TLK2	partial gene	#618050
4	muški	ANK3	frameshift	#615493

janti u uzročnim i kandidatnim genima bila je još veća u istraživanju na maloj skupini bolesnika s intelektualnim deficitom i popratnim anomalijama središnjeg živčanog sustava (26). Stoga, analiza WES-om bi se trebala primijeniti što ranije kod bolesnika s neurorazvojnim poremećajima, a ukoliko bude negativna, bolesnici su kandidati za analizu WGS-om, osobito ako imaju i popratne anomalije.

U našoj skupini bolesnika s malformacijama analiza WES-om je dovela do konačne dijagnoze u 40 %, u 15 % su pronađeni VUS-ovi u poznatim uzročnim genima, a u 20 % su pronađene potencijalne uzročne varijante u kandidatnim genima, dok je za 25 % bolesnika analiza bila negativna. Bolesnici s malformacijama često imaju i popratno razvojno zaostajanje pa se svrstavaju u skupinu bolesnika s neurorazvojnim poremećajima, dok se bolesnici s malformacijama bez razvojnog zaostajanja obično analiziraju unutar svoje specifične

**Tablica 3.** Rezultati analize WES-om neurorazvojnih poremećaja u kliničkim istraživanjima

Članak	Utvrđena dijagnoza, N (%)	Pronađeni kandidatni geni, N (%)	Ukupan broj bolesnika u istraživanju, N	Država
Soden et al.	34 (40)	N.P.	85	SAD
Yang et al.	504 (25,2)	N.P.	2000	SAD
Lee et al.	45 (41)	N.P.	109	SAD
Need et al.	6 (50)	1 (8,33)	12	SAD
de Ligt et al.	16 (16)	N.P.	100	Nizozemska
Schuurs-Hoeijmakers et al.	3 (16)	5 (26)	19	Nizozemska
Willemsen et al.	24 (41,4)	N.P.	58	Nizozemska
Monroe et al.	5 (29,4)	N.P.	17	Nizozemska
Vissers et al.	44 (29,3)	41 (27,3)	150	Nizozemska
Thevenon et al.	14 (32,5)	N.P.	43	Francuska
Sawyer et al.	31 (31,6)	N.P.	98	Kanada
Deciphering Developmental Disorders Study	317 (28)	N.P.	1133	UK
Rauch et al.	16 (31,4)	3 (5,88)	51	Njemačka
Shaheen et al.	28 (90,3)	N.P.	31	Saudijska Arabija
Anazi et al.	91 (55)	56 (24)	232	Saudijska Arabija
Naše istraživanje	22 (34,38)	10 (15,62)	64	Hrvatska

N.P. – nije prijavljeno

skupine, poput bolesnika s kongenitalnim anomalijama bubrega i urotrakta. Stoga, većina radova o učinkovitosti WES-a u dijagnosticiranju bolesnika s malformacijama se provodi na fetalnim uzorcima za koje su kariotipizacijom i array-CGH-om utvrđeni normalni kariotipovi. U radu od Petrovski i sur. analiza WES-om je dovela do konačne dijagnoze u 10 % slučajeva, a u 20 % slučajeva su pronađeni VUS-ovi (27). Fu i sur. su s pomoću analize WES-om utvrdili konačnu dijagnozu u 24 % slučajeva, a pronašli su VUS-eve u 12,8 % slučajeva (28). Guo i sur. su pronašli uzročne varijante u 60 % slučajeva, a VUS-eve u 20 % slučajeva u svom istraživanju, no bitno je naglasiti da su koristili trio-WES, a analizirali su samo obitelji s ponavljanim fetalnim malformacijama (29). Sustavnim pregledom i metaanalizom na 17 članaka o dijagnostičkoj učinkovitosti WES-a za fetuse s multiplim malformacijama utvrđeno je da je analiza WES-om dovela do konačne dijagnoze za trećinu slučajeva (30). Pokazano je da je stopa učinkovitosti WES-a u postavljanju dijagnoze za pedijatrijske bolesnika s malformacijama značajno veća nego za fetuse, stoga naši rezultati nisu protivni trendovima u drugim dijelovima svijeta (31).

U slučaju poremećaja koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav, a analizom specifičnih pa-

nela gena nije pronađena etiologija poremećaja, analizom WES-om je ustanovljena dijagnoza u oko petine slučajeva kod naših bolesnika. Među podskupinama, najveći uspjeh analize WES-om je bio u skupini bolesnika s neuromišićnim poremećajima, dok je najniži bio u skupini bolesnika s epilepsijama. Prema dosadašnjim istraživanjima, analizom WES-om moguće je postaviti genetičku dijagnozu neuromišićnog poremećaja u oko polovice slučajeva kod pedijatrijskih bolesnika, što se podudara s našim podacima (32). U istraživanju Perucca i sur. WES-om s analizom ciljanih gena vezanih uz epilepsiju utvrđena je dijagnoza u 12,5 % bolesnika, što je slično našim rezultatima, dok je korištenjem trio-WES-a za analizu pedijatrijskih bolesnika s neobjašnjenom epilepsijom utvrđena genetička dijagnoza u oko polovice bolesnika u istraživanju Chengyan i sur (33, 34).

Zaključno, WES je učinkovit genetički test za bolesnike s neurorazvojnim poremećajima i malformacijama te bi se trebao koristiti rano u dijagnostičkoj obradi jer može dovesti do uspostavljanja dijagnoze u oko trećine bolesnika, a u nekim slučajevima će se otkriti varijante u kandidatnim genima te se bolesnici mogu prijaviti u internacionalne baze podataka i na taj način pridonijeti uspostavljanju dijagnoze novih genetičkih bolesti. Od pore-

mećaja koji primarno zahvaćaju jedan organski sustav, analiza WES-om je učinkovita za neuromišićne poremećaje, dok bi se za ostale poremećaje trebali primarno koristiti ciljani paneli gena ili sekvenciranje kliničkog egzoma.

## Kratice:

ACMG	– engl. <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
Array-CGH	– komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju
KBC	– klinički bolnički centar
NGS	– sekvenciranja slijedeće generacije (engl. <i>next-generation sequencing</i> )
VUS	– varijanta nejasnog kliničkog značenja (engl. <i>variant of uncertain significance</i> )
WES	– cjeloegzomsko sekvenciranje (engl. <i>whole exome sequencing</i> )
WGS	– cjelogenomsko sekvenciranje (engl. <i>whole genome sequencing</i> )

## LITERATURA

- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003;422(6934):835–47. doi:10.1038/nature01626
- Smith ED, Blanco K, Sajan SA, Hunter JM, Shinde DN, Wayburn B, et al. A retrospective review of multiple findings in diagnostic exome sequencing: half are distinct and half are overlapping diagnoses. *Genet Med*. 2019;21(10):2199–207. doi:10.1038/s41436-019-0477-2
- Seaby EG, Pengelly RJ, Ennis S. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Brief Funct Genomics*. 2015;15(5):374–84. doi:10.1093/bfpg/elv054
- Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzenruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet*. 2015;89(3):275–84. doi:10.1111/cge.12654
- Marinakakis NM, Svingou M, Veltra D, Kekou K, Sofocleous C, Tilemis F, et al. Phenotype-driven variant filtration strategy in exome sequencing toward a high diagnostic yield and identification of 85 novel variants in 400 patients with rare Mendelian disorders. *Am J Med Genet A*. 2021;185(8):2561–71. doi:10.1002/ajmg.a.62338
- Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*. 2014;312(18):1870–9. doi:10.1001/jama.2014.14601
- Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*. 2014;312(18):1880. doi:10.1001/jama.2014.14604
- Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet*. 2019;28(1):165–73. doi:10.1038/s41431-019-0508-0
- Philippakis AA, Azzariti DR, Beltran S, Brookes AJ, Brownstein CA, Brudno M, et al. The Matchmaker Exchange: a platform for rare disease gene discovery. *Hum Mutat*. 2015;36(10):915–21. doi:10.1002/humu.22858
- Manickam K, McClain MR, Demmer LA, Biswas S, Kearney HM, Malinowski J, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2021;23(11):2029–37. doi:10.1038/s41436-021-01242-6
- Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung WK, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med*. 2019;21(11):2413–21. doi:10.1038/s41436-019-0554-6
- Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med*. 2014;370(25):2418–25. doi:10.1056/NEJMra1312543
- Stark Z, Schofield D, Alam K, Wilson W, Mupfeki N, Macciocca I, et al. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genet Med*. 2017;19(8):867–74. doi:10.1038/gim.2016.221
- Soden SE, Saunders CJ, Willig LK, Farrow EG, Smith LD, Petrikin JE, et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci Transl Med*. 2014;6(265):265ra168. doi:10.1126/scitranslmed.3010076
- Need AC, Shashi V, Hitomi Y, Schoch K, Shianna KV, McDonald MT, et al. Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet*. 2012;49(6):353–61. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100819
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921–9. doi:10.1056/NEJMoa1206524
- Schuurs-Hoeijmakers JHM, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LELM, van de Vondervoort IIGM, van Bon BWM, de Ligt J, et al. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet*. 2013;50(12):802–11. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101644
- Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet*. 2013;85(2):101–10. doi:10.1111/cge.12244

19. Monroe GR, Frederix GW, Savelberg SMC, de Vries TI, Duran KJ, van der Smagt JJ, et al. Effectiveness of whole-exome sequencing and costs of the traditional diagnostic trajectory in children with intellectual disability. *Genet Med*. 2016;18(9):949–56. doi:10.1038/gim.2015.200
20. Vissers LELM, van Nimwegen KJM, Schieving JH, Kamsteeg EJ, Kleefstra T, Yntema HG, et al. A clinical utility study of exome sequencing versus conventional genetic testing in pediatric neurology. *Genet Med*. 2017;19(9):1055–63. doi:10.1038/gim.2017.1
21. Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, Lefebvre M, Feillet F, El Chehadeh-Djebbar S, et al. Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. *Clin Genet*. 2016;89(6):700–7. doi:10.1111/cge.12732
22. Rauch A, Wiczorek D, Graf E, Wieland T, Endele S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380(9854):1674–82. doi:10.1016/S0140-6736(12)61480-9
23. Shaheen R, Patel N, Shamseldin H, Alzahrani F, Al-Yamany R, Al Moishier A, et al. Accelerating matchmaking of novel dysmorphology syndromes through clinical and genomic characterization of a large cohort. *Genet Med*. 2015;18(7):686–95. doi:10.1038/gim.2015.147
24. Anazi S, Maddirevula S, Faqeh E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry*. 2016;22(4):615–24. doi:10.1038/mp.2016.113
25. Gilissen C, Hahir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BWM, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*. 2014;511(7509):344–7. doi:10.1038/nature13394
26. Zahir FR, Mwenifumbo JC, Chun HJE, Lim EL, Van Karnebeek CDM, Couse M, et al. Comprehensive whole genome sequence analyses yield novel genetic and structural insights for intellectual disability. *BMC Genomics*. 2017;18(1). doi:10.1186/s12864-017-3671-0
27. Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet*. 2019;393(10173):758–67. doi:10.1016/S0140-6736(18)32042-7
28. Fu F, Li R, Li Y, Nie ZQ, Lei T, Wang D, et al. Whole exome sequencing as a diagnostic adjunct to clinical testing in fetuses with structural abnormalities. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(4):493–502. doi:10.1002/uog.18915
29. Guo W, Lai Y, Yan Z, Wang Y, Nie Y, Guan S, et al. Trio-whole-exome sequencing and preimplantation genetic diagnosis for unexplained recurrent fetal malformations. *Hum Mutat*. 2019;41(2):432–48. doi:10.1002/humu.23935
30. Pauta M, Martinez-Portilla RJ, Borrell A. Diagnostic yield of exome sequencing in fetuses with multisystem malformations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2022;59(6):715–22. doi:10.1002/uog.24862
31. Slavotinek A, Rego S, Sahin-Hodoglugil N, Kvale M, Lianoglou B, Yip T, et al. Diagnostic yield of pediatric and prenatal exome sequencing in a diverse population. *NPJ Genom Med*. 2023;8(1). doi:10.1038/s41525-023-00353-0
32. Piñeros-Fernández MC, Morte B, García-Giménez JL. Utility of exome sequencing for the diagnosis of pediatric-onset neuromuscular diseases beyond diagnostic yield: a narrative review. *Neurol Sci*. 2024;45(4):1455–64. doi:10.1007/s10072-023-07210-z
33. Perucca P, Scheffer IE, Harvey AS, James PA, Lunke S, Thorne N, et al. Real-world utility of whole exome sequencing with targeted gene analysis for focal epilepsy. *Epilepsy Res*. 2017;131:1–8. doi:10.1016/j.eplepsyres.2017.02.001
34. Chengyan L, Chupeng X, You W, Yinhui C, Binglong H, Dang A, et al. Identification of genetic causes in children with unexplained epilepsy based on trio-whole-exome sequencing. *Clin Genet*. 2024;106(2):140–9. doi:10.1111/cge.14519

### Adresa za dopisivanje:

Doc. dr. sc. **Bernarda Lozić**, dr. med.

Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Split  
Spinčićeva 1, 21 000 Split, Hrvatska

e-mail: [blozic@kbsplit.hr](mailto:blozic@kbsplit.hr)

SUMMARY

## Whole-exome sequencing in clinical application - experience of the Clinical Hospital Center Split

Bernarda Lozić, Marin Ogorevc, Tomislav Smoljo, Dora Knezović

*Objective:* To report on the effectiveness of whole-exome sequencing (WES) in patients at the University Hospital of Split from January 2021 to December 2024.

*Methods:* WES analysis was performed in 64 patients with neurodevelopmental disorders, 20 patients with malformations, and 53 patients with disorders primarily affecting one organ system.

*Results:* WES analysis led to a diagnosis in 34.38 % of patients with neurodevelopmental disorders, variants in genes potentially associated with the phenotype were found in 32.81 %, and in 32.81 % no significant variants were found. In the case of malformations, a diagnosis was established after WES analysis in 40 % of patients, variants in genes potentially associated with the phenotype were found in 35 %, and no significant variants were found in 25 %. Among disorders that primarily affect one organ system, WES analysis was most successful in the case of neuromuscular disorders (diagnosis established in 45.45 % of cases), and the least successful in patients with epilepsy (diagnosis established in 16.67 %).

*Conclusion:* WES is an effective genetic test for patients with neurodevelopmental disorders and malformations and should be used early in the diagnostic workup because it can lead to the establishment of a diagnosis in a large number of cases. As for disorders that primarily affect one organ system, WES analysis is effective for neuromuscular disorders, while for other disorders, targeted gene panels or clinical exome sequencing should be primarily used.

**Key words:** NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS; CONGENITAL ABNORMALITIES;  
EXOME SEQUENCING; HIGH-THROUGHPUT NUCLEOTIDE SEQUENCING